

Márcia Andreia Nogueira Ventura

Utilização terapêutica das células estaminais

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Porto, 2014

Márcia Andreia Nogueira Ventura

Utilização terapêutica das células estaminais

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Porto, 2014

Aplicações terapêuticas das células estaminais

Autora:

Márcia Andreia Nogueira Ventura

Título:

Utilização terapêutica das células estaminais

Assinatura:

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

RESUMO

Uma célula estaminal é uma célula indiferenciada que possui a capacidade de dar origem a outras células especializadas com diversas funções que estão de acordo com o tecido ou órgão que representam, permitindo assim uma panóplia de manipulações e utilidades clínicas. Elas podem classificar-se quanto à origem em células estaminais embrionárias e células estaminais adultas e quanto à potencialidade em células totipotentes, pluripotentes ou multipotentes.

As suas aplicações terapêuticas são variadas, existindo vários estudos com resultados positivos e outros que necessitam de uma investigação futura mais profunda, no entanto estas células podem ser utilizadas até mesmo com os novos sistemas terapêuticos. Ao longo da dissertação vão ser explorados temas como a terapia do cancro, a terapia cardiovascular e a terapia neural bem como algumas futuras apostas científicas nestas áreas.

Palavras-chave: células estaminais, aplicações terapêuticas, terapia

ABSTRACT

A stem cell is an undifferentiated cell that has the ability to give rise to other specialized cells with different functions that are consistent with the tissue or organ they represent, thus allowing a range of manipulations and clinical utility. They can be classified as to the origin in embryonic stem cells and adult stem cells and about the potential for totipotent, pluripotent or multipotent.

There are many therapeutic applications for these cells and there are several studies about this potential therapeutic use in the future with positive results and other that need further investigation in the future, these cells also can be used with the new therapeutic systems. Throughout the dissertation subjects such as cancer therapy, cardiovascular therapy and the neural therapy will be operated as well as some future scientific applications in these areas.

Key words: stem cells, therapeutics applications, therapy

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

Dedico a todas as pessoas que sempre acreditaram em mim e agradeço a todas aquelas que de uma forma ou de outra ou até de todas as formas me ajudaram na realização desta dissertação pois sem essa ajuda não seria a mesma coisa, principalmente à Professora Doutora Maria João Coelho que pacientemente me orientou em tudo o que precisei, um grande obrigado.

ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO	8
II-CÉLULAS ESTAMINAIS	9
1-Definição.....	9
2-Classificação das células estaminais.....	11
i. Origem	11
ii. Potencialidade	13
3-Fontes de células estaminais	15
4- Diferenciação das células estaminais.....	19
i. Diferenciação das células estaminais hematopoiéticas	19
ii. Diferenciação das células estaminais mesenquimais	21
5-Criopreservação.....	22
i. Bancos de criopreservação.....	22
6- Aplicações terapêuticas	24
i. Terapia do cancro	24
ii. Terapia cardiovascular	31
iii. Terapia neural.....	34
7- Células estaminais em Portugal	39
III-CONCLUSÃO	40
IV-BIBLIOGRAFIA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes origens das células estaminais.....	13
Figura 2 - Cordão umbilical, células mesenquimais e células hematopoiéticas.....	17
Figura 3 - Fontes de células estaminais e adultas.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

- CD – Cluster of differentiation ou grupo de diferenciação
- DR – Death receptors ou recetores de morte
- EpiSC – Epiblast stem cells ou Células Estaminais do Epiblasto
- Ex. - Exemplo
- HLA- Antígeno Leucocitário Humano
- IFN- β – Interferão β
- IPO- Instituto Português de Oncologia
- iPSCs – Induced pluripotent stem cells ou Células Estaminais Pluripotentes Induzidas
- IPST – Instituto Português do Sangue e da Transplantação
- NK – Natural Killer
- RET - Rearranged during transfection
- SCU – Sangue do Cordão Umbilical
- TCU – Tecido do Cordão Umbilical
- TNF – Tumor necrosis factor ou fator de necrose tumoral
- TRAIL - Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Induced Ligand
- S-TRAIL – Secretable Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Induced Ligand
- USSC – Unrestricted Somatic Stem Cell ou Células Estaminais Somáticas Não Restritas

I- INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como objetivo abordar o tema células estaminais relativamente às suas aplicações terapêuticas na área do cancro, cardiovascular e neural, sendo três grandes áreas e com grande importância. Estas células ao longo dos últimos anos têm sido vistas como uma terapêutica inovadora e promissora para o tratamento de muitas doenças inclusive doenças auto imunes e outras consideradas incuráveis.

Uma célula estaminal é uma célula indiferenciada com capacidade de dar origem a células especializadas com varias funções de acordo com o tecido ou órgão que representam (Shah, 2013), permitindo uma panóplia de manipulações e utilidades clínicas. Elas podem classificar-se quanto à origem em células estaminais embrionárias e células estaminais adultas e quanto à potencialidade em totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

As principais fontes de células estaminais são o sangue do cordão umbilical e a medula óssea, sendo que em Portugal, o primeiro transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical que foram criopreservadas num banco privado português, foi a 19 de Fevereiro de 2007. Esta intervenção foi realizada no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO) numa criança de 14 meses com leucemia linfoblástica aguda e foi muito bem-sucedida salvando-lhe assim a vida (Carvalho, 2007).

Existem 4 bancos de recolha de células estaminais que são privados e autorizados pela Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação: Crioestaminal, Bebê Vida, Criovida e Instituto Valenciano de Fertilidade (Cabo, 2012) e existe um público, a LUSOCORD.

Em relação às aplicações terapêuticas, existem vários estudos acerca deste potencial uso terapêutico, alguns já realizados e outros ainda em fase de realização. Ao longo do desenvolvimento do tema vão ser explorados temas como a terapia do cancro, cardiovascular e neural bem como a futuros avanços científicos.

II-CÉLULAS ESTAMINAIS

1-Definição

A utilização de células estaminais tem gerado um enorme interesse no mundo da ciência, pois são vistas como tendo um grande potencial para o tratamento de diversas doenças. Segundo muitos investigadores, as células estaminais são a grande promessa para a cura de doenças consideradas até aos dias de hoje incuráveis como Parkinson e Alzheimer, entre outras (Serrão, 2004).

As células estaminais são células indiferenciadas que dão origem a células especializadas com variadas funções de acordo com o tecido ou órgão que representam. Possuem três grandes características:

- são pluripotentes, pois dão origem a várias células filhas que por sua vez se diferenciam em vários tipos celulares específicos sob a influência do microambiente em que estão inseridas (Shah, 2013);
- têm grande capacidade de proliferação e de divisão;
- têm grande capacidade de autorrenovação (Gomes e Pranke, 2008).

As células estaminais embrionárias (isoladas diretamente do embrião) possuem uma grande capacidade de autorrenovação indefinida devido à alta expressão da telomerase, já nas células estaminais adultas (isoladas após o nascimento), a atividade da telomerase parece ser menor, o que limita a sua capacidade de persistência a longo prazo (Shah, 2013). São estas as células responsáveis pela renovação celular bem como o crescimento e respetiva reparação dos tecidos desde o nascimento até à vida adulta (Watt e Driskell, 2010).

Novos estudos indicam que até mesmo as células maduras podem ser reprogramadas para se tornarem pluripotentes, estas são designadas de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs). Elas são formadas a partir de células somáticas humanas ou até de ratos e pela expressão forçada de fatores de transcrição definidos, tornam-se em células mais primitivas de modo a tornarem-se outra vez

pluripotentes. As iPSCs possuem boas propriedades de autorrenovação e pluripotência tal como as células estaminais embrionárias, o que lhes conferem um enorme potencial para futuras terapias (Bragança, Tavares e Belo, 2010). Um dos estudos realizados com as células iPSCs, foi organizado por um grupo de cientistas da Universidade de Pittsburgh na Pensilvânia, que utilizaram as iPSCs para criar células precursoras cardíacas. Ainda estão longe de fazerem com que um coração humano inteiro bombeie, no entanto, os resultados deste estudo podem ser usados para que futuramente seja possível substituir um pedaço de tecido danificado por um ataque cardíaco, ou até um órgão inteiro, nos doentes que possuem uma doença cardíaca (Lu *et al.*, 2013).

2-Classificação das células estaminais

i. Origem

As células estaminais podem ser classificadas quanto à sua origem em células estaminais embrionárias ou células estaminais adultas.

As células estaminais embrionárias, são isoladas diretamente do embrião na fase inicial do seu desenvolvimento, sendo retiradas da massa interna do blastocisto que se forma entre o 4º e 6º dia do desenvolvimento embrionário e possuem uma grande capacidade de diferenciação. Podem dar origem a qualquer célula do corpo humano, sendo consideradas pluripotentes, com a exceção dos tecidos extraembrionários (Cabeleira *et al.*, 2010). As suas características permitem que mesmo após estarem um tempo indefinido *in vitro* podem dar origem a descendência (Fozard *et al.*, 2011). As células estaminais embrionárias pluripotentes normalmente são isoladas do epiblasto (tecido derivado do botão embrionário que futuramente se diferencia para formar as três camadas germinais do embrião de onde derivam todos os tecidos e órgãos), antes da sua implantação no útero, no entanto, também podem ser isoladas após a implantação do blastocisto designando-se de células estaminais do epiblasto (EpiSC). As EpiSC não contribuem para a formação de um embrião, no entanto, são capazes de se diferenciarem em vários tipos celulares (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

As questões éticas e morais surgem como um dos grandes problemas relativamente ao uso clínico destas células (Correia e Bragança, 2010), com a exceção da recolha destas a partir de embriões e fetos abortados espontaneamente (Serrão, 2004). As células estaminais embrionárias possuem uma maior capacidade de diferenciação e plasticidade que as células estaminais adultas e identificam-se e isolam-se mais facilmente pois existem em maior número (Correia e Bragança, 2010).

As células estaminais adultas são células que se encontram presentes nos órgãos e tecidos fetais e adultos, tendo assim várias proveniências desde o sangue do cordão umbilical, placenta, tecido adiposo, medula óssea, sangue periférico e tecidos maduros.

Estas células são isoladas depois do nascimento e têm como principal função a reparação e manutenção dos tecidos e órgãos sempre que necessário (Correia e Bragança, 2010), são também consideradas multipotentes (Bragança, Tavares e Belo, 2010). O seu potencial de diferenciação é menor que o das células estaminais embrionárias. Após a sua diferenciação e através de um estado transitório, ocorre a formação de uma célula precursora ou progenitora que futuramente dará origem à célula especializada (Correia e Bragança, 2010).

As células estaminais adultas encontram-se em estado de repouso por longos períodos de tempo, mas são ativadas quando estimuladas por hormonas e/ou fatores de crescimento ou por lesões tecidulares (Cruz *et al.*, 2009).

A identificação das células estaminais adultas é feita de acordo com três critérios, os bioquímicos, os histológicos e os morfológicos. Em relação ao isolamento e identificação das células estaminais adultas, visto que estas células existem em pequenos nichos celulares no nosso organismo, muitas vezes em pequenas quantidades e já que algumas são morfológicamente idênticas às células adultas especializadas, torna-se complicado fazer o seu isolamento e identificação. No entanto, elas possuem proteínas e fatores de transcrição específicos (ex: recetores membranares), logo, utilizam-se essencialmente estes fatores na sua marcação citológica (Correia e Bragança, 2010).

Quanto às questões éticas e morais, estas células levantam menos problemas que as células estaminais embrionárias, visto serem retiradas após o nascimento e não em tecidos fetais. São menos propensas à formação de tumores, por possuírem uma menor plasticidade e capacidade de proliferação, sendo que o facto de já estarem programadas para originar células diferenciadas também se torna numa vantagem. Por outro lado apresentam também algumas desvantagens: menor capacidade de proliferação, podem conter um maior número de erros genéticos devido a possíveis exposições a agentes mutagénicos ou erros durante a replicação e são de difícil identificação e isolamento (Correia e Bragança, 2010). As células estaminais adultas podem ser reprogramadas para voltarem a ser pluripotentes pela transferência de um núcleo adulto para um citoplasma de um ócito ou pela fusão com uma célula pluripotente (Watt, Ryan e

Driskell, 2010).

ii. Potencialidade

As células estaminais podem ser classificadas quanto à sua potencialidade em células estaminais totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, tal como se pode observar na figura (1).

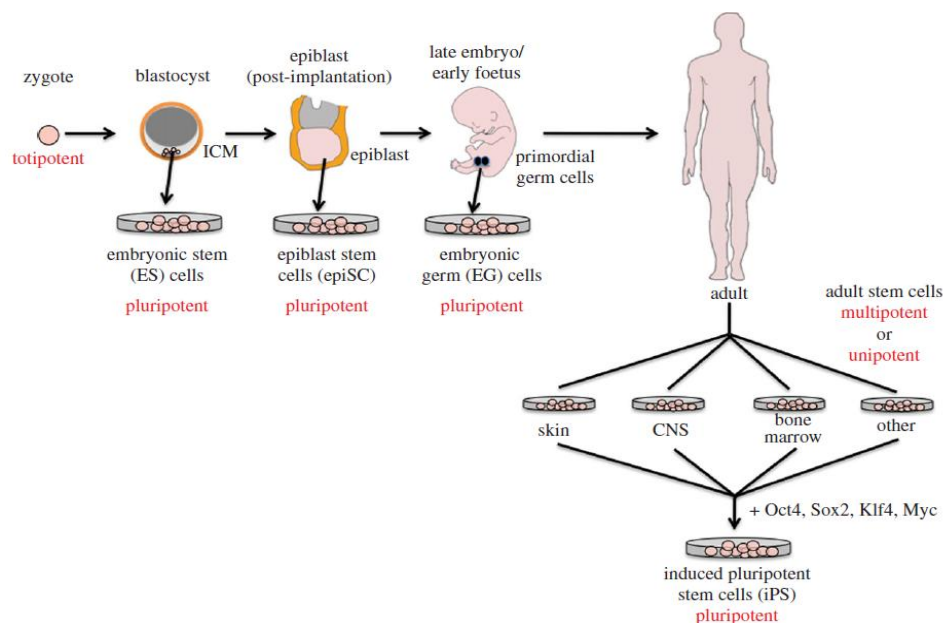


Figura 1 - Diferentes origens das células estaminais (Watt e Driskell, 2010).

Células estaminais totipotentes - são células que possuem a máxima capacidade de diferenciação, isto é, são células capazes de se dividir e produzir todas as células do organismo, estas células são as células do embrião recém-formado (Souza *et al.*, 2003). O ovo fertilizado é a célula estaminal com maior potencial de diferenciação (Bebé Vida, 2010) bem como os blastómeros que são as células que constituem a mórula, sendo também estas duas as únicas células totipotentes (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

Células estaminais pluripotentes - têm a capacidade de se diferenciar em células que derivam das diferentes camadas embrionárias que são a mesoderme, (que origina os músculos, ossos, sangue e sistema urogenital), endoderme (que origina o trato gastrointestinal e os pulmões) e ectoderme (que origina os tecidos epidermais e sistema nervoso), estas camadas germinativas provêm do botão embrionário (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

Estas células contêm células estaminais embrionárias e podem dar origem a qualquer tipo de célula fetal ou adulta, mas não podem por si próprias desenvolver-se num organismo fetal ou adulto porque não possuem a capacidade de criar tecido extraembrionário, como a placenta. Nos casos em que o tecido é constituído por uma única linhagem diferenciada, as células estaminais que mantêm essa linhagem são designadas de unipotentes (Watt e Driskell, 2010).

Células estaminais multipotentes - são células limitadas na sua capacidade de diferenciação e são designadas de acordo com o órgão do qual provêm, originando exclusivamente as células daquele órgão. São células que estão presentes no indivíduo adulto (Souza *et al.*, 2003).

3-Fontes de células estaminais

O sangue do cordão umbilical (SCU) representa uma das principais fontes de células estaminais embrionárias pois as células estaminais adultas que aí residem estão em menor número, logo, torna-se numa fonte muito promissora de células na área da medicina regenerativa, nos transplantes hematopoiéticos e para o tratamento de diversas doenças de origem hemato-oncológica. O sangue do cordão umbilical é rico nos seguintes tipos de células (Cabeleira *et al.*, 2010):

- células estaminais hematopoiéticas;
- células progenitoras endoteliais;
- células estaminais mesenquimais;
- células USSC (Unrescited Somatic Stem Cell ou Células Estaminais Somáticas Não Restritas);
- células estaminais embrionic-like (Cabeleira *et al.*, 2010).

As células estaminais hematopoiéticas são as que dão origem às várias células da linhagem sanguínea que por sua vez se dividem na linhagem linfóide, responsável pela formação das células do sistema imunitário (linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (Natural Killer)), e a linhagem mieloide que origina as células do sistema sanguíneo (monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos, plaquetas e células dendríticas) (Bragança, Tavares e Belo, 2010). As células estaminais hematopoiéticas são muito utilizadas nas transfusões sanguíneas em pacientes com doenças hematológicas malignas, onde os resultados têm sido muito positivos (Cabeleira *et al.*, 2010).

Torna-se então numa grande vantagem o uso das células estaminais hematopoiéticas para os tratamentos da talassemia e leucemia (Lim *et al.*, 2013). As principais fontes destas células são a medula óssea, sangue periférico e o cordão umbilical (Lim *et al.*, 2013). No entanto, estas principais fontes possuem um uso limitado em quantidade, bem como outros problemas associados como o número limitado de dadores, imunorreacções, contaminação viral, escassez de dadores compatíveis com o HLA (Antigénio Leucocitário Humano) e efeitos adversos de

excerto versus hospedeiro, limitando assim o seu uso, logo, torna-se necessário a obtenção de células estaminais hematopoiéticas por outras fontes tal como a indução de células estaminais pluripotentes (Lim *et al.*, 2013).

As células progenitoras endoteliais são as que originam as células endoteliais que constituem os vasos sanguíneos (Cabeleira *et al.*, 2010).

As células estaminais mesenquimais diferenciam-se em várias linhagens tal como as células ósseas, cartilagem, células musculares e células do tecido adiposo. Alguns estudos sugerem a possibilidade de se diferenciarem também em células neurais (Cabeleira *et al.*, 2010).

As USSC são consideradas células estaminais mesenquimais primitivas, uma vez que também se podem diferenciar em células do tecido adiposo, células neurais, células ósseas, cartilagem e ainda em células sanguíneas e do músculo cardíaco (Cabeleira *et al.*, 2010).

As células estaminais embrionic-like dão origem a células características das três linhas germinativas como a ectoderme (células neurais), mesoderme (células sanguíneas) e endoderme (células hepáticas) (Cabeleira *et al.*, 2010).

O primeiro transplante de células estaminais do SCU foi em 1988 em Paris numa criança com anemia de Fanconi onde foi utilizada uma amostra de células estaminais compatível com a criança proveniente de um irmão, a amostra foi criopreservada e depois transplantada na criança com sucesso. Este procedimento veio aumentar o interesse nas células estaminais retiradas do sangue do cordão umbilical pois contêm células em quantidades suficientes para uma futura reconstituição hematopoiética e imunológica do doente. O sangue do cordão umbilical é hoje considerado uma fonte vantajosa em alternativa ao transplante de medula óssea (Cabeleira *et al.*, 2010).

Já em Portugal, o primeiro transplante com SCU foi realizado em 1994 no IPO (Instituto Português de Oncologia) de Lisboa, para o tratamento de uma criança com leucemia mieloide crónica (Crioestaminal, 2013). A figura 2 mostra as células do cordão

umbilical.

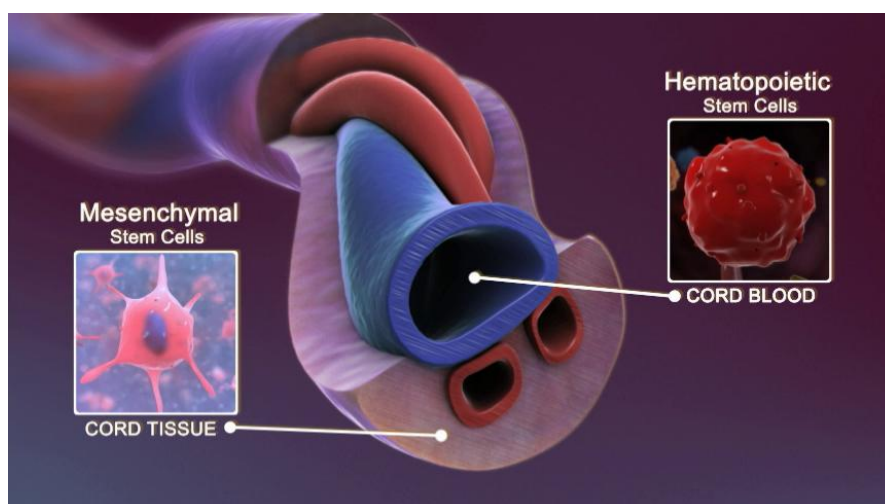


Figura 2 - Cordão umbilical, células mesenquimais e células hematopoiéticas (The Stem Cell Source, 2012)

Também podem ser obtidas células no tecido do cordão umbilical (TCU), que se encontra entre a pele e os vasos sanguíneos, e que é rico em células estaminais mesenquimais com propriedades diferentes das células do sangue do cordão umbilical (Crioestaminal, 2013). A principal diferença entre as células mesenquimais do cordão umbilical, relativamente às células mesenquimais dos tecidos adultos, é o facto das células mesenquimais do cordão umbilical não possuírem um Complexo Maior de Histocompatibilidade completo, visto que os genes do subgrupo II e um gene do subgrupo I estão ausentes. Isto é importante quanto à compatibilidade entre o dador e o recetor para transplantes alogénicos, pois a probabilidade de ocorrer uma rejeição do transplante por parte do recetor é muito baixa mesmo não havendo uma histocompatibilidade completa entre ele e o dador (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

O TCU é considerado a melhor fonte de obtenção das células mesenquimais pois aí encontram-se em grande quantidade incluindo o seu grau de imaturidade (Cardoso *et al.*, 2012).

As células mesenquimais têm a capacidade de se autorrenovarem e diferenciarem em várias linhagens, incluindo o tendão, a cartilagem, o músculo, o estroma da medula, o osso e o tecido adiposo. Elas são capazes de modelar a resposta

imunológica e podem ser utilizadas em simultâneo nos transplantes alogênicos de células estaminais hematopoiéticas, com o objetivo de reduzirem as complicações imunológicas associadas a este tipo de transplantes, o que aumenta a probabilidade de sucesso dos mesmos (Cardoso *et al.*, 2012). Outros locais onde podem ser retiradas as células mesenquimais são: medula óssea, músculo, osso trabecular, derme, tecido adiposo, periósteo, pericito, sangue e membrana sinovial (Tuan, Boland e Tuli, 2003).

As principais fontes de células estaminais adultas são a medula óssea, a polpa dentária, o sangue periférico, o cérebro, a espinal medula, os vasos sanguíneos, os músculos esqueléticos, o epitélio da pele e do sistema digestivo, a córnea, a retina, o fígado e o pâncreas, entre outros (Cabeleira *et al.*, 2010). As células estaminais adultas mais estudadas e utilizadas são as células estaminais hematopoiéticas, mesenquimais, neurais e epiteliais.

Visto que a cada tipo de tecido corresponde um tipo de célula estaminal adulta e apesar de muitas já estarem identificadas, futuramente muitas outras irão ser descobertas. A figura 3 ilustra um breve resumo das fontes de células estaminais e adultas.

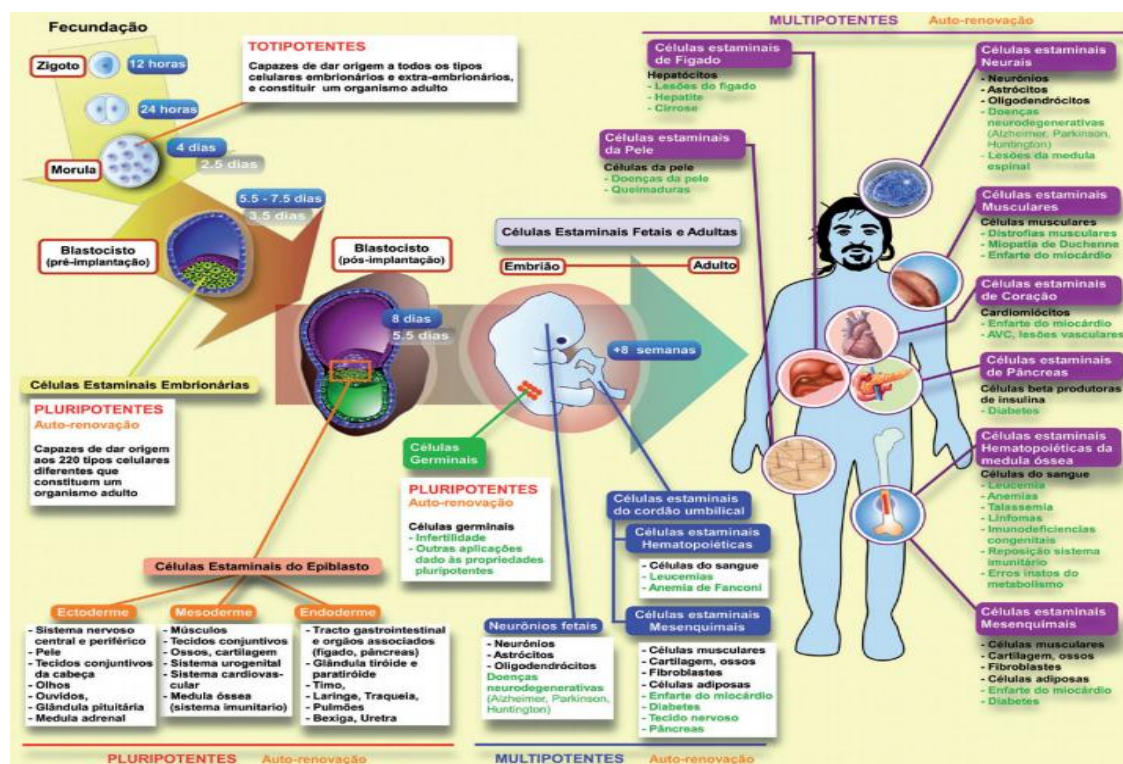


Figura 3 - Fontes de células estaminais e adultas (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

4- Diferenciação das células estaminais

As células estaminais embrionárias formam-se ao longo da embriogénese. Este processo inicia-se com a formação do zigoto que após algumas divisões celulares da mórula, torna-se no blastocisto (esfera oca composta por um conjunto de células externas – trofoblasto - que formam uma cavidade – blastocélio), que apresenta um conjunto de células designadas de botão embrionário. Após a formação do blastocisto, as células começam a perder a potencialidade inicial de se especializarem em qualquer célula do organismo. O trofoblasto só dá origem aos tecidos extra-embrionários, já o botão embrionário dá origem ao epiblasto que é o precursor do embrião, de onde surgem as três camadas embrionárias que são a mesoderme, ectoderme e endoderme (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

Após o nascimento, as células isoladas passam, tal como referido anteriormente, a designar-se por células estaminais adultas. Elas podem dividir-se por dois tipos de divisão celular: a divisão celular simétrica e a divisão celular assimétrica (Correia e Bragança, 2010).

Pela divisão celular simétrica são originadas duas células filhas com as mesmas propriedades da célula mãe. Elas sofrem vários ciclos de divisão celular até receberem estímulos pelo microambiente onde estão inseridas para se diferenciarem nas células necessárias ao organismo naquele momento. As células filhas deixam de se dividir simetricamente e passam então a dividir-se assimetricamente o que leva à formação de células mais especializadas. Pensa-se que este fenómeno de passagem de uma divisão celular simétrica para uma divisão celular assimétrica acontece pela segregação diferencial das proteínas membranares entre as células filhas (Correia e Bragança, 2010).

i. Diferenciação das células estaminais hematopoiéticas

A diferenciação celular é o processo que leva à expressão fenotípica das características pertencentes a uma célula madura *in vivo*, a partir de uma célula indiferenciada. Após a diferenciação, a capacidade de divisão celular diminui (Cruz *et al.*, 2009).

As células estaminais hematopoiéticas têm grande importância pois darão origem às duas principais linhagens hematopoiéticas (linhagem linfóide e linhagem mieloide). Estas células encontram-se em fase de repouso na medula óssea e na superfície trabecular do osso onde estão em constante movimento, por exemplo, passam do seu compartimento no fêmur para o seu compartimento na tíbia, o que permite que elas se mantenham em vários locais do corpo. O fígado e o baço também contêm estas células no entanto, em condições normais que levam à hematopoiese, só ocorre uma diferenciação limitada das células hematopoiéticas. A ocorrência de estímulos para induzir a hematopoiese, que não se limita só ao sistema hematopoiético, pode aumentar a formação de células sanguíneas, indicando que estes órgãos são capazes de ativar nichos facultativos que ajudam a manutenção das células estaminais hematopoiéticas e a hematopoiese durante muito tempo. Por exemplo, uma lesão na pele pode levar à formação de novos folículos capilares e depois preenchidos por células estaminais (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

Sob estímulos específicos como as lesões do tecido, as células estaminais hematopoiéticas passam do estado de repouso para o estado ativo na medula óssea pois é controlado por uma rede complexa de fatores de crescimento e de citocinas, procedendo à sua especialização. Existem sinais de que estas células podem participar na regeneração dos tecidos periféricos (foram localizadas noutros órgãos como na pele, no músculo, nos pulmões, no baço, no fígado, nos tecidos do sistema nervoso e gastrointestinal), estimulando assim o sistema imunológico, quer por fusão celular adquirindo depois propriedades das células com as quais se fundem, quer por transdiferenciação (Bragança, Tavares e Belo, 2010) (processo em que uma célula já diferenciada é induzida a transformar-se num outro tipo de célula) (Mezey *et al.*, 2003) em células envolvidas na reparação dos tecidos danificados, embora este último mecanismo não esteja totalmente comprovado (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

ii. Diferenciação das células estaminais mesenquimais

As células mesenquimais podem ser isoladas de diversas fontes como nos tecidos conjuntivos da grande maioria dos órgãos, sendo mais utilizadas para fins terapêuticos as que são retiradas da medula óssea e do sangue do cordão umbilical, que apesar de serem morfológicamente semelhantes, são funcionalmente diferentes (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

Estas células podem ser facilmente obtidas em cultura e já foram demonstradas as suas capacidades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, estando por isso a serem testadas para o tratamento de doenças inflamatórias autoimunes. Têm também um efeito benéfico sobre a regeneração de órgãos pois promovem um ambiente adequado a esse processo. Criando condições específicas no meio de cultura, elas podem transformar-se em vários tipos celulares como cardiomiócitos, células neuronais, células pulmonares entre outras. Esta propriedade confere-lhes um grande potencial para o tratamento de diversas doenças, no entanto as suas propriedades de diferenciação *in vivo* ainda não estão demonstradas, podendo também serem transplantadas de maneira autóloga (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

5-Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de conservação das células estaminais a temperaturas muito baixas (-196°C). Após este procedimento, as células podem ser utilizadas a qualquer momento e em qualquer lado sem que percam a sua viabilidade (Crioestaminal, 2013).

Segundo um estudo realizado na Tailândia, após a criopreservação de embriões humanos durante dezoito anos, a pluripotência não foi afetada. Os embriões mantiveram a sua pluripotência semelhante aos embriões frescos mesmo após todos aqueles anos (Pruksananonda *et al.*, 2012).

O principal motivo de rejeição das amostras é a contaminação microbiológica, pois em doentes imunocomprometidos o transplante torna-se num risco, sendo o momento de colheita o período mais crítico. Uma boa alternativa é a profilaxia antibiótica aquando da realização do transplante para a prevenção de futuras complicações clínicas. Para minimizar o risco de contaminação das amostras de sangue do cordão umbilical e tecido do cordão umbilical torna-se muito importante a desinfeção do local da punção com iodopovidona e de seguida com álcool, aguardando alguns segundos antes da realização da punção para permitir a atuação dos desinfetantes. Em alternativa a este processo existe um segundo processo de desinfeção cutânea que passa pelo uso de uma solução de base alcoólica com 2% de cloroexidina. Acima de tudo a recolha das células estaminais deve ser feita em condições assépticas e o operador deve também contribuir para isso, atuando com cuidado e profissionalismo (Cardoso *et al.*, 2012).

i. Bancos de criopreservação

Em Portugal existem apenas 4 bancos privados de recolha de células estaminais autorizados pela Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação, o que significa que preenchem os requisitos da lei nº12/2009 de 26 de Março. São eles a Crioestaminal, a Bebé Vida, a Criovida e o Instituto Valenciano de Fertilidade (Cabo,

2012).

Existe também um banco público para a recolha de células estaminais em Portugal, a LUSOCORD, que já esteve encerrado pois segundo Hélder Trindade, o presidente do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST), o encerramento deveu-se a motivos de “irregularidades na recolha, transporte e conservação das células estaminais”, contudo estas irregularidades foram corrigidas para permitir a sua reabertura (Veludo, 2012). A LUSOCORD foi reaberta para recolher células estaminais por enquanto só no Hospital de S. João no Porto (Rosa, 2014).

A lei nº12/2009 de 26 de Março “estabelece o regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana” (Lei 12/2009).

No geral, para permitir a recolha das células estaminais por um banco, procede-se ao ato de inscrição, o consentimento informado, uma entrevista feita à mãe e por fim o envio do kit de colheita. Este processo é acompanhado por uma equipa de psicólogos para esclarecimento de todas as dúvidas que possam surgir (Sequeiros e Neves, 2012).

6- Aplicações terapêuticas

As células estaminais mesenquimais possuem a capacidade de se transformar em vários tipos de células, e podem ser cultivadas e manipuladas *in vitro* com alguma facilidade, esta característica levou a que se gerasse um grande interesse na sua utilização como agentes terapêuticos para o tratamento de muitas doenças. Elas podem ser isoladas a partir da medula óssea, do tecido adiposo e do sangue do cordão umbilical, e possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em linhagens mesenquimatosas osteocíticas, condrocíticas e adipogénicas (Shah, 2012).

Alguns estudos demonstraram que as células mesenquimais migram do sítio onde estão alojadas, através do endotélio para os locais da lesão, isquemia e microambientes tumorais, no entanto, ainda não são completamente conhecidos os mecanismos pelo qual isso acontece, porém esses estudos mostraram que esta migração depende dos diferentes pares de citocinas / recetores (Shah, 2012).

i. Terapia do cancro

Uma célula estaminal tumoral é uma célula que está presente no tumor e que possui como características principais a capacidade de autorrenovação e de formar várias linhagens de células cancerígenas heterogéneas que fazem parte do tumor. A célula estaminal tumoral passa por uma divisão assimétrica para a formação de duas células filhas idênticas ou então forma uma célula filha e uma célula progenitora diferenciada, provocando assim o aumento do tumor (Han *et al.*, 2013). A transição epitelial-mesenquimal é um mecanismo que gera células estaminais tumorais com um fenótipo mais hostil e com a capacidade de gerar metástases (Alison, Lim e Nicholson, 2011).

Nos últimos anos têm dado grande importância às proteínas de identificação das células estaminais cancerígenas pois estas regulam os seus vários fenótipos e, devido a um grande conhecimento sobre essas proteínas, a manipulação farmacológica torna-se num importante investimento no futuro (Lasorella, Benezra e Lavarone, 2014).

As células estaminais tumorais possuem como características principais:

- autorrenovação - após serem transplantadas, renovam-se indefinidamente;
- diferenciação - capacidade de originar células filhas tumorais por divisão celular simétrica, também geram grandes populações de células não tumorais por divisão celular assimétrica;
- tumorigenicidade - quando transplantadas em animais, mesmo em pequenas quantidades, estas células podem formar tumores, já as células estaminais normais não conseguem;
- marcadores de superfície específicos – podem ser diferenciadas das células estaminais normais por conterem marcadores específicos como por exemplo o CD133, CD24 e CD44 (Han *et al.*, 2013).

As células estaminais tumorais e as células estaminais normais possuem semelhanças em alguns aspetos tais como na capacidade de autorrenovação, capacidade de originar descendência especializada, expressão de marcadores de superfície específicos, oncogenes, utilização das vias de sinalização comuns, importância dos seus nichos e atividade tumoral. Foram realizados alguns ensaios *in vitro* para identificar as células estaminais tumorais, como por exemplo: ensaio do corante de exclusão Hoechst, ensaio da deteção de marcadores de superfície, entre outros (Han *et al.*, 2013).

As células estaminais de cancro ou tumorais, isoladas a partir de leucemias mieloides agudas, apresentam marcadores de superfície distintos das restantes células tumorais e encontram-se em pequenas quantidades nos pacientes afetados. Supõe-se que as células leucémicas estaminais resultam da transformação de células estaminais hematopoiéticas em células malignas. São resistentes à quimioterapia e à radioterapia, o que explica a recorrência do cancro bem como a formação das suas metástases (Bragança, Tavares e Belo, 2010), por isso se diz que um paciente com cancro, mesmo após uma resposta positiva ao tratamento, não deverá ser considerado completamente curado (Clevers, 2011).

A radioterapia e a quimioterapia ajudam a diminuir os tumores pois matam as células tumorais ativas, no entanto, não eliminam as células estaminais tumorais em

repouso (Han *et al.*, 2013). Estas células mantêm-se nos locais metastáticos até serem ativadas pelos sinais enviados pelo microambiente onde estão inseridas (Cruz *et al.*, 2009). Elas podem também ir para locais distantes e serem então responsáveis pelas metástases e recidivas que podem aparecer anos após o tratamento do primeiro cancro (Clevers, 2011). Estes tratamentos levam à toxicidade sistémica ou local, tornando-se então necessário a criação de novos tratamentos que visam eliminar as células estaminais tumorais e não as células normais, aumentando assim a taxa de sobrevivência e o tempo de vida do paciente (Han *et al.*, 2013).

Foram também identificadas outras células estaminais de cancro em tumores sólidos, como por exemplo no cancro da mama. Supõe-se então que a grande parte das células num tumor teriam um potencial de proliferação limitado mas apesar da população de células estaminais de cancro ser pequena, estas possuem capacidade de autorrenovação e de proliferação (Bragança, Tavares e Belo, 2010). As células estaminais de cancro são responsáveis pela iniciação e desenvolvimento do tumor, metástases e resistência terapêutica (Han *et al.*, 2013). Assim sendo, o cancro é uma doença que envolve a desregulação da autorrenovação das células estaminais normais por mutações oncogénicas e outros defeitos genéticos e epigenéticos (Bragança, Tavares e Belo, 2010), desregulação da proliferação da apoptose e falha dos mecanismos reguladores da diferenciação celular. Existe uma relação inversa entre a capacidade de diferenciação e o grau de malignidade, o que torna válida a ideia da aplicação de medidas terapêuticas que levam as células tumorais a diferenciarem-se (Cruz *et al.*, 2009).

O que se tem feito é procurar identificar os marcadores de superfície celular específicos das células estaminais de cancro, de modo a permitir o seu isolamento e expansão em cultura. Assim, torna-se possível um estudo aprofundado das diferenças das vias de sinalização entre as células estaminais tumorais e normais, levando à formulação de fármacos que têm como alvo a destruição seletiva das células tumorais sem afetar as normais, esta situação representa um avanço importante para terapias anticancerígenas adaptadas às necessidades específicas de cada paciente (Bragança, Tavares e Belo, 2010).

As células estaminais mesenquimais possuem um futuro promissor como agentes anticancerígenos pois possuem propriedades migratórias, o que lhes permite serem usadas como veículos de distribuição de fármacos no tratamento de tumores isolados ou de metástases nos diferentes tipos de cancro. Nos últimos anos têm vindo a ser detetados precocemente alguns tipos de cancro, o que, combinado com o desenvolvimento de alguns fármacos específicos para o tratamento, aumentou a taxa de sobrevivência dos doentes. No entanto, o curto tempo de semivida de alguns fármacos e a sua distribuição limitada em alguns tipos de tumor juntamente com os seus efeitos tóxicos sobre as células não tumorais, impedem a cura (Shah, 2012).

Quanto ao transplante de células estaminais hematopoéticas, existem duas aplicações das células estaminais mesenquimais. A primeira refere-se a uma melhoria do enxerto com células estaminais e a aceleração da reconstituição hematopoética com base na capacidade de suporte da hematopoiese. A segunda refere-se ao tratamento da doença enxerto-versus-hospedeiro, tendo como base a capacidade imunomoduladora destas células (Ozawa *et al.*, 2008), pois elas através da secreção de fatores solúveis (como por exemplo fatores de crescimento, prostaglandinas e através de interações diretas do sistema imunológico), elas vão suprimir a atividade das células T citotóxicas, das células B e das células NK (Natural Killers), obtendo por isso propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Bragança, Tavares e Belo, 2010). Quanto à capacidade imunossupressora, o óxido nítrico está envolvido na supressão mediada pelas células estaminais mesenquimais na proliferação de células T. As células estaminais mesenquimais podem ser utilizadas para combater tumores metastáticos e para distribuir moléculas anti-tumorais no local alvo. Por fim, podem também servir como veículo celular na terapia génica (Ozawa *et al.*, 2008).

As células estaminais mesenquimais não modificadas têm demonstrado efeitos anti-tumorais *in vitro* e nos diferentes modelos de ratos com cancro. Isto deve-se aos fatores libertados por elas que por sua vez possuem propriedades anti-tumorais, reduzindo assim a proliferação do glioma, melanoma, cancro do pulmão, hepatoma, e células do cancro da mama (Shah, 2012).

As interleucinas, (citocinas que regulam as respostas inflamatórias e imunitárias),

possuem efeitos anti-tumorais através de efeitos tumoricidas diretos ou através da modulação positiva do sistema imunitário (Shah, 2012). Foram utilizadas de forma eficiente para serem distribuídas pelas células estaminais com a finalidade de vigiar o sistema imunitário anti-cancro (Shah, 2013) pela ativação de linfócitos citotóxicos e dos linfócitos NK (Shah, 2012).

Os linfócitos NK são uma fonte promissora de linfócitos para a imunoterapia antitumoral, eles fazem parte do sistema imunitário inato e possuem uma grande atividade antitumoral sem necessidade de correspondência ao HLA (Antigénio Leucocitário Humano) e sem exposição prévia ao antígeno. As células NK produzidas a partir de células estaminais pluripotentes podem proporcionar uma fonte ilimitada de linfócitos. Utilizou-se um sistema de cultura em duas fases para produzir as células NK a partir de células estaminais embrionárias e de iPSCs (células estaminais pluripotentes induzidas) na ausência de separação de células e sem necessidade de células xenogénicas do estroma. Estes métodos podem ser usados para produzir linhas celulares com células NK funcionais em quantidades suficientes para tratar um paciente (Knorr *et al.*, 2013).

As células estaminais mesenquimais também são utilizadas na distribuição do interferão β (IFN- β) para inibir o crescimento do tumor e tem realmente demonstrado ter efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos. No entanto, a sua eficácia terapêutica *in vivo* tem sido limitada devido à toxicidade associada pela administração sistémica (Shah, 2012). As células estaminais mesenquimais provenientes da medula óssea que segregam IFN- β obtiveram bons resultados na diminuição de tumores como o melanoma, cancro da mama e metástases pulmonares (Shah, 2013).

Existem mecanismos de ativação de pró-fármacos que converte os pró-fármacos não tóxicos em antimetabolitos tóxicos, estes mecanismos estão direcionados para a morte seletiva das células tumorais. A ativação de pró-fármacos que não são tóxicos para as células estaminais mesenquimais, são as apropriadas para eliminar o tumor e para o uso como "bombas" farmacológicas (Shah, 2012).

Os vírus oncolíticos são vírus naturais ou geneticamente modificados que após

infetarem o hospedeiro, replicam-se seletivamente, levando as células tumorais à morte mas preservando as células normais (Shah, 2012). As terapias para o cancro utilizando os vírus oncolíticos, baseiam-se na utilização de vírus seletivos para o tumor com capacidade replicativa, mas com uma toxicidade limitada (Shobana, Samal e Elankumaran, 2013). A administração sistêmica de vírus oncolíticos é muitas vezes ineficaz em parte devido à sua eliminação pelos mecanismos de defesa do organismo, daí a necessidade de utilizar as células estaminais mesenquimais como células hospedeiras para a replicação, transporte e libertação no local a qual se destina, de modo a proteger o vírus das defesas do organismo e direcioná-los para os tumores (Shah, 2012).

A angiogénese tumoral é um meio do tumor crescer e obter as suas necessidades energéticas por meio de uma rede de vasos sanguíneos. A destruição dessa rede é importante para limitar o crescimento do tumor (Weis e Cheresh, 2011). As células estaminais mesenquimais têm sido utilizadas para distribuir moléculas anti-angiogénicas, que por si só levam à normalização vascular aumentando assim a resposta imune anti-tumoral e a expressão de agentes anti-angiogénicos (Shah, 2012).

Existe uma nova abordagem para a eliminação de células tumorais que é a distribuição de proteínas pró-apoptóticas através de células estaminais. Temos o exemplo do TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis induced ligand) (Shah, 2012), que é um membro endógeno pertencente à família do ligando TNF (tumor necrosis factor)). Esta molécula liga-se ao seu domínio de morte que contém os receptores DR4 e DR5 (death receptors) (Shah, 2013), induzindo a apoptose através da ativação de caspases, preferencialmente nas células cancerígenas, não afetando a maioria dos outros tipos de células. Através de um estudo usando células malignas do glioma humano, foi demonstrado que a junção das células estaminais mesenquimais com o S-TRAIL (secretable tumor necrosis factor-related apoptosis induced ligand) que é uma proteína recombinante, migrou em grande escala para os tumores no cérebro e possui grandes efeitos anti-tumorais *in vivo*. Isto demonstra a eficácia terapêutica de S-TRAIL e o potencial das células estaminais mesenquimais para serem utilizadas como veículos de distribuição tendo como alvo as células estaminais do glioblastoma (Shah, 2012).

Quanto aos antagonistas dos fatores de crescimento, existe um número limitado que podem ser expressos nas células estaminais e libertados no meio extracelular. No entanto, após programar as células estaminais mesenquimais para expressarem determinados antagonistas dos fatores de crescimento tumoral, foi demonstrado um efeito anti-metastásico devido à inibição da angiogénese e linfoangiogénese nos tecidos tumorais (Shah, 2012).

Estes tratamentos podem não ser completamente eficazes, mas uma boa alternativa será abranger vários alvos terapêuticos distintos de modo a erradicar completamente os diferentes tipos de tumor (Shah, 2012).

Nos últimos anos, os novos sistemas terapêuticos têm captado a atenção dos investigadores e as células estaminais mesenquimais têm sido vistas com grande potencial para serem utilizadas como um veículo de entrega para a terapia genética do cancro (Hu *et al.*, 2010), pois possuem como principais vantagens o facto de serem fáceis de isolar e expandir, possuem uma boa capacidade de escape ao sistema imunitário, têm um grande tropismo para os tumores e suas metástases seguindo a via sistémica e podem aguentar a amplificação dos vírus oncolíticos (Dwyer e Kerin, 2010).

A tecnologia do encapsulamento de células refere-se à introdução das células no interior de membranas semipermeáveis e biocompatíveis. A vantagem desta encapsulação é que permite a distribuição de moléculas durante um longo período de tempo pois as células libertam as moléculas de forma contínua, dando origem a boas concentrações fisiológicas quando comparado com a encapsulação de proteínas (Shah, 2013).

O encapsulamento das células estaminais mesenquimais é um bom método para a distribuição localizada de fármacos. Foram utilizados hidrogéis biodegradáveis e matrizes extracelulares sintéticas devido à sua capacidade em fornecer um ambiente fisiológico, o que promove a sobrevivência celular e previne a resposta imune, permitindo uma fácil transplantação *in vivo* e retenção celular. Existem vários biomateriais que podem ser utilizados para a encapsulação, tais como o alginato, agarose (Shah, 2012), ácido hialurónico entre outros polímeros. A encapsulação de

células estaminais terapeuticamente modificadas em hidrogéis proporciona uma barreira física para proteger as células das agressões externas melhorando a eficácia da terapêutica das células transplantadas nos diferentes tipos de cancro (Shah, 2013).

As terapias baseadas nas células estaminais mesenquimais necessitam de ser monitorizadas de modo a aumentar a eficácia da terapêutica (Shah, 2012).

ii. Terapia cardiovascular

Na terapia cardiovascular, as células estaminais têm tido um grande interesse terapêutico pela sua grande capacidade de diferenciação em células específicas (Lopes *et al.*, 2013). O músculo cardíaco possui uma capacidade de regeneração limitada, por isso têm sido estudadas técnicas recorrendo a células estaminais adultas retiradas do próprio paciente como por exemplo da medula óssea ou do tecido adiposo (Cabeleira *et al.*, 2010).

As células estaminais mesenquimais podem ser obtidas de diversas fontes e possuem como características uma boa disponibilidade, viabilidade, plasticidade, sendo capazes de expressar fenótipos similares aos cardiomiócitos, em meios mais específicos de diferenciação (Carvalho *et al.*, 2012).

Foi realizado um estudo que comparou três protocolos distintos de indução da diferenciação das células estaminais mesenquimais com o objetivo de escolher um método viável para a diferenciação do maior número de células funcionais que expressem o fenótipo cardiomiogénico. Nos três protocolos utilizados observou-se a formação da proteína alfa-actinina sarcomérica no citoesqueleto celular, a expressão do marcador de superfície conexina 43 na membrana nuclear e citoplasmática e formação das junções de gap, necessárias para a propagação do impulso elétrico no miocárdio, no entanto, em nenhum protocolo foi observada a contração espontânea das células submetidas à diferenciação cardiogénica (Carvalho *et al.*, 2012).

As células estaminais mesenquimais são consideradas células promissoras

devido às suas características intrínsecas. Possuem um potencial imunomodulador, com ação anti-inflamatória e antiapoptótica, o que é fundamental para tratar os mecanismos patológicos envolvidos nas doenças que afetam o sistema cardiovascular e possuem também um potencial de transdiferenciação em cardiomiócitos (Lopes *et al.*, 2013).

Um estudo feito por Dai e colaboradores (2007), mostrou num modelo de rato que a injeção de um meio contendo fatores celulares produzidos por células estaminais mesenquimais, levava à regeneração do miocárdio numa situação pós-enfarte, embora houvesse uma regeneração menos marcada do que quando acompanhada pela injeção das próprias células mesenquimais. Após um enfarte do miocárdio, torna-se complicado para as células estaminais mesenquimais sobreviverem no ambiente que lá existe, o que leva à morte precoce de muitas das que lá são aplicadas. No entanto, alguns estudos mostraram que o pré-condicionamento isquêmico das células pode ajudar a melhorar esta situação, melhorando assim o tratamento (Lopes *et al.*, 2013).

Os vários estudos realizados sugerem que a terapia celular apresenta bons níveis de segurança e viabilidade. Ensaio, como por exemplo o ADVANCE, comparam as diferentes doses de células estaminais mesenquimais da linhagem adiposa com o efeito placebo. Também existem ensaios que focam o pré-tratamento das células injetadas pelo pré-condicionamento isquêmico ou por diferentes meios de cultura. Noutros estudos, os doentes com cardiopatia isquêmica crónica foram submetidos a uma injeção intramiocárdica de células estaminais mesenquimais pré-tratadas com melatonina, pois há dados que demonstram que o pré-tratamento com este composto aumenta a sobrevivência, a atividade parácrina e a eficácia terapêutica das células estaminais mesenquimais em modelos realizados com ratos (Lopes *et al.*, 2013).

A modificação genética das células estaminais mesenquimais também possui um grande potencial no sentido de as fazer sobre expressar determinados fatores que aumentam a sua migração para o órgão de origem, diferenciação na linhagem cardíaca ou eficácia dos efeitos parácrinos, mas é fundamental garantir a segurança da técnica, pois a introdução de alterações genéticas pode levar à acumulação futura de erros no código genético. No entanto resultados de vários estudos já realizados e outros ainda em realização, demonstram que a terapia celular apresenta níveis de segurança e viabilidade fiáveis (Lopes *et al.*, 2013).

A medula óssea é a fonte mais procurada para a obtenção de células estaminais para a reparação miocárdica, esta contém células estaminais hematopoiéticas, células progenitoras adultas multipotenciais e células estaminais mesenquimais. O procedimento passa pela anestesia, depois procede-se à aspiração da medula óssea, as células retiradas são isoladas nas sub-populações desejadas e de seguida são administradas no coração sem haver uma expansão *ex-vivo*. As expansões são feitas quando algumas sub-populações de células demonstram serem mais vantajosas em relação a outras (Gonçalves, 2008). As células estaminais do SCU também são uma boa fonte neste contexto, pois possuem potencial cardiomiogénico, tal como o demonstrado em modelos animais, em que estas células contribuem para a angiogénese, melhorando então a função cardíaca (Cabeleira *et al.*, 2010).

A aplicação das células estaminais do cordão umbilical pode ser feita através da infusão direta no miocárdio, na circulação sanguínea ou nas coronárias. Ocorre uma migração seletiva das células estaminais para o tecido danificado, observando-se um aumento da densidade de capilares no local, diminuição da área do enfarte e melhoria da função cardíaca, até na ausência de miogénese. Existem algumas hipóteses acerca dos mecanismos de regeneração cardíaca:

- produção de fatores de crescimento angiogénicos, devido à hipóxia tecidular, observando-se *in vivo* e *in vitro* a formação de novos vasos sanguíneos, bem como a migração de células estaminais endógenas do coração, sendo este considerado o mecanismo principal;
- as células estaminais do SCU diferenciam-se em cardiomiócitos, o que não seria suficiente para a recuperação da função cardíaca;
- por último, a capacidade de modulação da inflamação que se obtém pelo controlo da expressão de moléculas que pertencem à cadeia da resposta inflamatória (Cabeleira *et al.*, 2010).

Estudos efetuados em animais, verificaram que as células estaminais do SCU contribuem para a regressão dos efeitos de isquémia dos membros. Em pacientes com a doença de Buerger, os resultados sugeriram uma melhoria significativa da circulação sanguínea periférica e da cicatrização de lesões do epitélio (Cabeleira *et al.*, 2010).

As células progenitoras que se encontram na circulação sanguínea periférica também podem ser utilizadas na reparação do miocárdio ou na terapia angiogénica da doença vascular periférica. Há um isolamento das células a partir das células mononucleares sanguíneas, que são depois cultivadas *ex-vivo* num meio de cultura específico para as células endoteliais e por fim alguns dias depois são injetadas no coração (Gonçalves, 2008).

Para além das células estaminais do SCU existem células que poderão ser boas alternativas, como por exemplo as células estaminais pluripotenciais derivadas do tecido adiposo, pequenas subpopulações de células pluripotenciais da medula óssea e do músculo-esquelético, células estaminais somáticas e células progenitoras que residem no coração (Gonçalves, 2008).

Segundo Nascimento e colaboradores (2014), as células estaminais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical humano preservam a função cardíaca após um transplante intramiocárdico como demonstrado num estudo realizado em murinos com enfarte do miocárdio. Os efeitos cardioprotetores destas células foram atribuídos a mecanismos parácrinos que aumentam a angiogénese, limitam a amplitude da apoptose, aumentam a proliferação e ativam um conjunto de células cardíacas progenitoras adultas que residem no coração do murino. Com estes resultados, as células estaminais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical humano devem então ser consideradas como uma boa alternativa para a criação de novas abordagens terapêuticas no tratamento do enfarte do miocárdio (Nascimento *et al.*, 2014).

iii. Terapia neural

A ideia de que o cérebro não possui capacidade para se regenerar alterou-se nos últimos anos com a descoberta de nichos de células estaminais neurais com a capacidade de gerar novos neurónios no cérebro. Recorrendo a células estaminais, tornou-se então possível pensar em novas estratégias neuroprotetoras, que podem

prevenir a morte neuronal resultante da agressão ao cérebro, bem como o desenvolvimento de técnicas reparadoras do tecido nervoso que foi previamente afetado (Malva e Bernardino, 2010).

Segundo Malva e Bernardino (2010), no sistema nervoso existem as células estaminais neurais e as células progenitoras com proliferação contínua em nichos específicos, o que permite a produção das células do sistema nervoso que posteriormente se irão colocar nos respetivos circuitos neurais para realizarem a sua função. É então de grande importância entender o desenvolvimento, diferenciação e migração das células imaturas, obtendo assim um processo de substituição de neurónios mortos pelas novas células e a sua integração funcional no cérebro (Malva e Bernardino, 2010).

Existem dados que demonstram que as células ependimárias são células estaminais neurais, dão origem a células com rápida proliferação que produzem neurónios e depois migram para o bulbo olfativo. Em resposta à lesão medular, a proliferação das células ependimárias aumenta para produzir células que se diferenciam em astrócitos e que depois migram, participando também na formação da cicatriz, havendo então uma identificação de um novo processo que acontece aquando de uma lesão no sistema nervoso central (Johansson *et al.*, 1999).

A neurogénese pode também ser estimulada em resposta à agressão cerebral, criando-se na zona lesionada um ambiente que permite que a neurogénese aconteça, o que estimula a produção de novas células neurais e facilita a migração de células progenitoras para as zonas da lesão. Esta neurogénese funciona como um processo com um grande potencial reparador do cérebro (Malva e Bernardino, 2010).

As células estaminais do SCU demonstraram em vários estudos, poderem-se diferenciar *in vitro* e utilizando marcadores específicos, em neurónios e oligodendrócitos. Foi exposto o caso de uma senhora paraplégica que após transplantada com células do SCU, recuperou uma parte da perceção sensorial e da mobilidade dos membros inferiores. Em estudos com animais, o tratamento endovenoso com células estaminais do SCU, demonstraram atrasar a progressão de doenças como o

Parkinson e Alzheimer e até mesmo o aparecimento dos sintomas característicos das doenças, no entanto ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares através do qual essa regeneração acontece. No entanto, estes resultados animadores obtidos com modelos animais, só vêm favorecer o estudo em humanos (Cabeleira *et al*, 2010).

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa, que resulta da perda dos neurónios produtores da dopamina presentes na substância negra, sendo caracterizada por sintomas motores característicos tais como o tremor, a rigidez, a bradicinesia e a instabilidade postural. O tratamento clássico passa pela administração de levodopa, cirurgia da lesão neural e estimulação profunda do cérebro, embora estes procedimentos tenham sido eficazes na melhoria dos sintomas, o transplante dos neurónios produtores de dopamina ou de células estaminais neurais tornou-se numa boa alternativa para o tratamento desta doença. De entre os vários tipos de células estaminais, as iPSCs são as consideradas com maior potencialidade para este tipo de terapia, no entanto possuem alguns inconvenientes tal como a necessidade do recurso a embriões humanos e a possibilidade de haver rejeição pelo sistema imunológico do paciente (Chen *et al.*, 2011).

Essa rejeição dificulta a aplicação das iPSCs ao nível do tratamento clínico bem como a dificuldade na obtenção de neurónios produtores de dopamina, no entanto, estas células possuem um grande potencial para o estudo da patogenia da doença de Parkinson e são também uma boa fonte de terapia de substituição. Yamanaka e colaboradores (2006, 2007) foram os primeiros a conseguir induzir células iPSCs através da reprogramação de fibroblastos embrionários e adultos de rato, com quatro fatores de transcrição, (Oct4, Sox2, Klf4 e c- Myc) sob condições de cultura das células estaminais embrionárias. Apesar desta descoberta, ainda não se sabe se estes quatro fatores conseguirão formar células pluripotentes a partir de células somáticas humanas uma vez que a utilização do fator c-Myc pode não ser adequada em aplicações clínicas e pode ser necessário ambientes de cultura específicos (Takahashi e Yamanaka, 2006; Okita, Ichisaka e Yamanaka, 2007). Estudos realizados em animais demonstraram que as células iPSCs derivadas dos fibroblastos poderiam ser transplantadas no interior do sistema nervoso central e melhorar os sintomas motores num dos modelos utilizados para a doença de Parkinson. As células iPSCs específicas do paciente podem ser

reprogramadas e posteriormente diferenciadas em neurónios dopaminérgicos, o que proporciona um bom modelo *in vitro* para a patologia da doença, rastreio de drogas e terapia com células estaminais personalizada. São necessários realizar estudos futuros quanto à transformação celular e aos processos de reprogramação para criar as células iPSCs de doenças específicas para poderem ser utilizadas na medicina personalizada de regeneração nos pacientes com a doença de Parkinson, revelando assim mecanismos de reprogramação detalhados (Chen *et al.*, 2011).

A doença de Alzheimer é também uma doença neurológica degenerativa cuja perda de memória é o sintoma mais característico, embora também existam outros sintomas como depressão, perda de inibição, delírios, agitação, ansiedade e agressividade. Atualmente não existe nenhum tratamento através do qual os sintomas comportamentais sejam tratados e os mais benéficos são específicos de um determinado sintoma (Shruster e Offen, 2014).

A terapia com células estaminais neurais poderá funcionar como um tratamento, havendo potencial para substituir os atuais fármacos utilizados, ou até mesmo como uma futura cura futura para o Alzheimer. Estudos sobre as células iPSCs têm demonstrado bons resultados embora o essencial e o mais difícil de controlar seja a diferenciação celular. Para o desenvolvimento deste tipo de terapia, existem ainda alguns obstáculos incluindo questões éticas e técnicas no controlo da diferenciação celular, daí terem sido estudados novos métodos para ajudar a controlar e a compreender a diferenciação das células estaminais neurais, tal como juntar os sinais solúveis (fatores de crescimento ou insulina), com os padrões da proteína presentes na matriz extracelular, qualidades micro ambientais *in vivo*, e substratos de crescimento convencionais (Liu e Larson, 2014).

O professor Daniel Offen e o Dr. Adi Shruster da Universidade de Tel Aviv Scackler School of Medicine descobriram que ao restabelecer uma população de novas células na parte do cérebro que está associada ao comportamento, alguns dos sintomas da doença de Alzheimer diminuem significativamente ou até se invertem completamente. O estudo teve ratos como modelos, proporcionando um alvo promissor para os sintomas da doença em seres humanos. O estudo baseia-se na introdução de

células estaminais no tecido cerebral de ratos com sintomas da doença de Alzheimer. O gene (Wnt3a) foi introduzido na parte do cérebro que controla o comportamento, para testar a formação de genes que produzem as novas células do cérebro. O aumento da produção de células estaminais numa determinada área do cérebro teve um efeito benéfico sobre os défices comportamentais da doença de Alzheimer. Entretanto, a investigação passou para a área do cérebro que controla a memória, esperando-se resultados semelhantes (Shruster e Offen, 2014).

7- Células estaminais em Portugal

Em Portugal existe alguma investigação em relação às células estaminais, visto este tema ter ganho uma grande importância ao longo dos anos. Existem algumas evoluções sobre este assunto tal como as notícias abaixo descritas.

Um grupo de investigadores do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina de Lisboa, identificaram uma proteína presente nas células estaminais hematopoiéticas designada de RET (Rearranged During Transfection), a ativação desta proteína melhora a sobrevivência das células estaminais hematopoiéticas, a sua expansão e a eficiência *in vivo* do transplante, contribuindo assim para o êxito dos transplantes nos doentes com leucemia ou linfomas. Este estudo também nos mostra que os fatores neurotróficos são os novos componentes presentes do microambiente das células estaminais hematopoiéticas, revelando que as células estaminais hematopoiéticas e os neurônios são reguladas por sinais semelhantes (Fonseca-Pereira *et al.*, 2014).

Recentemente (fevereiro de 2014), a Crioestaminal registou uma patente internacional para uma nova aplicação de células estaminais do cordão umbilical, na regeneração do tecido cardíaco após enfarte do miocárdio. Esta patente resultou de uma investigação que permitiu que as células estaminais fossem injetadas diretamente no músculo cardíaco, para que este, após um enfarte, seja capaz de cicatrizar mais depressa e regenerar as suas funções. A metodologia passou pela utilização de células estaminais hematopoiéticas em conjunto com um lípido bioativo (ácido lisofosfatídico), conjugadas num gel necessário para as células manterem a sua estabilidade, permitindo-lhes aumentar a sua sobrevivência fora do seu ambiente natural. A investigação decorreu em modelos animais, sendo ainda cedo para uma futura utilização em humanos. A Crioestaminal aponta o ano 2015 para a realização de ensaios clínicos testando assim a segurança e eficácia em humanos desta técnica, bem como de outra patente, centrada nas células estaminais do cordão umbilical desenvolvida para a cicatrização de feridas relacionadas com o pé diabético, registada em 2012 (Anon, 2014).

III-CONCLUSÃO

Sabe-se que existe nos últimos anos um estudo intensivo no sentido de criar terapêuticas inovadoras com as células estaminais, trazendo esperança e até cura para muitas doenças. Estas células têm uma vasta aplicação clínica, no entanto ainda é necessário continuar com os ensaios e estudos de modo a tornar válidos alguns dos seus resultados na prática clínica.

Quanto às aplicações terapêuticas existe uma grande lista de alternativas onde alguns resultados são positivos como aquelas que estão expostas ao longo da dissertação, incluindo outras que estão ainda em fase de estudo e muitas outras aplicações terapêuticas que não foram faladas.

Em Portugal não existe muita investigação acerca deste tema, no entanto a Crioestaminal, que é um banco privado de criopreservação em Portugal, tem apostado na divulgação, investigação e conhecimento das células estaminais, contribuindo assim para colocar Portugal num local onde se pode desenvolver terapias celulares eficazes. Este banco tem também alguns projetos em seguimento bem como parcerias com instituições importantes nesta área.

A recolha de células estaminais é um processo simples que poderá ser muito útil no futuro, por isso proceda à recolha das células estaminais no momento do parto e guarde num banco à sua escolha.

IV-BIBLIOGRAFIA

Alison, M.R., Lim, S.M. e Nicholson, L.J. (2011). Cancer stem cells: problems for therapy? *Journal of Pathology*, 223(2):147-161.

Anon. (2014). Portugal registou patente para utilização de células estaminais em doentes cardíacos. *Jornal de Notícias*, [Em linha]. Disponível em: <http://www.jn.pt/PaginaInicial/Sociedade/Saude/Interior.aspx?content_id=3697712> [Consultado em 06/09/14].

Bebé. Vida. (2010). Células Estaminais. [Em linha]. Disponível em: <http://bebevida.pt/canais.asp?id_canal=109> [Consultado em 06/09/14].

The Stem Cell Source: Cord Blood and Beyond. (2012). Animation Illustrates Newborn Stem Cells Effect on Spinal Cord Injury. [Em linha]. Disponível em: <http://cordblood.net/cc/blog/CBR_SCI_05.jpg> [Consultado em 06/09/14].

Bragança, J., Tavares, A. e Belo, J. (2010). Células estaminais e medicina regenerativa - Um admirável mundo novo. *Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7:4-17.

Cabeleira, A., Vieira, M., Matos, T., Gomes, A. e Rivera, D. (2010). O sangue do cordão umbilical em medicina regenerativa: uma revisão dos avanços científicos mais recentes. *Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa*, 4(2):81-87.

Cabo, A. (2012). A falta de legislação foi "inadmissível". *Boletim da Ordem dos Advogados*, (87):21-23. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.oa.pt/upl/{e72e095f-6640-4531-889b-60121fa7b557}.PDF>> [Consultado em 06/09/14].

Cardoso, C., Brito, M., Gomes, A. e Machado, A. (2012). Recentes evoluções na área das células estaminais neonatais do sangue e tecido do cordão umbilical. *Revista da Associação Portuguesa dos Enfermeiros Obstetras*, 12:66-67.

Carvalho, J. (2007). Transplante de células estaminais salva criança. [Em linha].

Disponível em: <www.dn.pt/inicio/interior.aspx?content_id=659661> [Consultado em 06/09/14].

Carvalho, P., Daibert, A., Monteiro, B., Okano, B., Carvalho, J., Cunha, D., Favarato, L., Pereira, V., Augusto, L. e Carlo, R. (2012). Diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em cardiomiócitos. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 100(1):82-89.

Chen, L.W., Kuang, F., Wei, L.C., Ding, Y.X., Yung, K.K. e Chan, Y.S. (2011). Potential application of induced pluripotent stem cells in cell replacement therapy for Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 10(4):449-458.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17(3):313-319.

Correia, R. e Bragança, J. (2010). Células estaminais adultas em medicina. *Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7:18-23.

Crioestaminal. (2013). Dossier Informativo sobre células estaminais. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.crioestaminal.pt>> [Consultado em 06/09/14].

Cruz, M., Enes, M., Pereira, M., Dourado, M. e Ribeiro, A. (2009). Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 15(4):669-682.

Dai, W., Hale, S. e Kloner, R. (2007). Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regenerative Medicine*, 2(1):63-68.

Dwyer, R.M., Khan, S., Barry, F.P., O'brien, T. e Kerin, M.J. (2010). Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Research & Theraphy*, 1(3):25.

Fonseca-Pereira, D., Arroz-Madeira, S., Rodrigues-Campos, M., Barbosa, I.A., Domingues, R.G., Bento, T., Almeida, A.R., Ribeiro, H., Potocnik, A.J., Enomoto, H. e Veiga-Fernandes, H. (2014). The neurotrophic factor receptor RET drives haematopoietic stem cell survival and function. *Nature*, In press.

Fozard, J.A., Kirkham, G.R., Buttery, L.D., King, J.R., Jensen, O.E. e Byrne, H.M. (2011). Techniques for analysing pattern formation in populations of stem cells and their progeny. *BMC Bioinformatics*, 12:396.

Gomes, T. e Pranke, P. (2008). Comparação entre as células-tronco de sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros e nascidos a termo: uma revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 40(1):25-30.

Gonçalves, L. (2008). O Regresso ao Passado: Terapêutica da Regeneração Miocárdica. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 27(9):1045-1060.

Han, L., Shi, S., Gong, T., Zhang, Z. e Sun, X. (2013). Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 3(2):65-75.

Hu, Y.L., Fu, Y.H., Tabata, Y. e Gao, J.Q. (2010). Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 147(2):154-162.

Johansson, C.B., Momba, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U. e Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96(1):25-34.

Knorr, D.A., Ni, Z., Hermanson, D., Hexum, M.K., Bendzick, L., Cooper, L.J., Lee, D.A. e Kaufman, D.S. (2013). Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(4):274-283.

Lasorella, A., Benezra, R. e Iavarone, A. (2014). The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nature Reviews Cancer*, 14(2):77-91.

Lei n.º12/2009. Diário da República. 1ª Série. N.º 60. 26 de Março. (2009). Estabelece o regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana, transpondo para a ordem jurídica interna as Directivas n.ºs 2004/23/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março, 2006/17/CE, da Comissão, de 8 de Fevereiro, e 2006/86/CE, da Comissão, de 24 de Outubro.

Lim, W.F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K.S., Lai, M.I. e Sugiyama, D. (2013). Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3):71.

Liu, J. e Larson, K. (2014). Neural stem cell therapy: The potential and practicality for sustainably treating Alzheimer's Disease. Fourteenth Annual Freshman Engineering Conference. Pittsburgh. [Em linha]. Disponível em: <<http://136.142.82.187/eng12/Chair/pdf/4050.pdf>> [Consultado em 06/09/14].

Lopes, J., Fiarresga, A., Cunha, P., Feliciano, J. e Ferreira, R. (2013). Terapia celular cardíaca com células mesenquimatosas. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 32(1):43-47.

Lu, T.Y., Lin, B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G. e Yang, L. (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature Communications*, 4:2307.

Malva, J. e Bernardino, L. (2010). Células estaminais neurais: A caminho da reparação cerebral? *Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7:24-29.

Mezey, É. (2003). On the Origin of Newly Made Neural Cells in the Adult Organism: Does Transdifferentiation Occur?. In: Bottenstein, J.E. (Ed.). *Neural Stem Cells*. Nova Iorque, Springer, pp. 181-206.

Nascimento, D.S., Mosqueira, D., Sousa, L.M., Teixeira, M., Filipe, M., Resende, T.P., Araujo, A.F., Valente, M., Almeida, J., Martins, J.P., Santos, J.M., Barcia, R.N., Cruz, P., Cruz, H. e Pinto-Do, O.P. (2014). Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1):5.

Okita, K., Ichisaka, T. e Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151):313-317.

Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., Mizukami, H. e Kume, A. (2008). Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *Journal of Autoimmunity*, 30(3):121-127.

Pruksananonda, K., Rungsiwiwut, R., Numchaisrika, P., Ahnonkitpanit, V., Isarasena, N. e Virutamasen, P. (2012). Eighteen-year cryopreservation does not negatively affect the pluripotency of human embryos: evidence from embryonic stem cell derivation. *BioResearch Open Access*, 1(4):166-173.

Rosa, C. (2014). Doar para salvar. *Notícias Magazine*, [Em linha]. Disponível em: <http://www.jn.pt/revistas/nm/interior.aspx?content_id=2990742> [Consultado em 06/09/14].

Sequeiros, J. e Neves, M. (2012). Relatório sobre os bancos de sangue do cordão umbilical, tecido do cordão umbilical e placenta. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida, 67:1-35

Serrão, D. (2004). Células Estaminais provenientes de Seres Humanos. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.danielserrao.com/gca/index.php?id=107>> [Consultado em 06/09/14].

Shah, K. (2012). Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(8):739-748.

- Shah, K. (2013). Encapsulated stem cells for cancer therapy. *Biomatter*, 3(1):1-7.
- Shobana, R., Samal, S.K. e Elankumaran, S. (2013). Prostate-specific antigen-retargeted recombinant newcastle disease virus for prostate cancer virotherapy. *Journal of Virology*, 87(7):3792-3800.
- Shruster, A. e Offen, D. (2014). Targeting neurogenesis ameliorates danger assessment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 261:193-201.
- Souza, V., Lima, L., Reis, S., Ramalho, L. e Santos, J. (2003). Células-tronco: uma breve revisão. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2(2):251-256.
- Takahashi, K. e Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663-676.
- Tuan, R.S., Boland, G. e Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Research & Therapy*, 5(1):32-45.
- Veludo, F. (2012). Banco público de células estaminais vai ser reaberto. *Público*, [Em linha]. Disponível em: <<http://www.publico.pt/sociedade/noticia/banco-publico-de-celulas-estaminais-vai-ser-reaberto-1576335>> [Consultado em 06/09/14].
- Watt, F.M. e Driskell, R.R. (2010). The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 365(1537):155-163.
- Weis, S.M. e Cheresch, D.A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*, 17(11):1359-1370.